

## 〈特集〉

## 日本版 WET の導入と取組み

藤原尚美<sup>1)</sup>、野中 信一<sup>2)</sup>、豊久志朗<sup>3)</sup>、鑪迫典久<sup>4)</sup><sup>1)</sup> ㈱神鋼環境ソリューション 技術開発センター  
(〒651-2241 神戸市西区室谷1-1-4 E-mail: n.fujiwara@kobelco-eco.co.jp)<sup>2)</sup> ㈱神鋼環境ソリューション 技術開発センター  
(〒651-2241 神戸市西区室谷1-1-4 E-mail: s.nonaka@kobelco-eco.co.jp)<sup>3)</sup> ㈱イー・アール・シー高城  
(〒885-1312 宮崎県都城市高城町四家831-5 E-mail: s.toyohisa@kobelco-eco.co.jp)<sup>4)</sup> 国立研究開発法人 国立環境研究所 環境リスク研究センター  
(〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2 E-mail: tatarazako.norihisa@nies.co.jp)

## 概要

生物影響試験の導入と試験結果の信頼性を確保するための標準物質を用いた感受性試験に取組み、金属製品製造業の工場排水について生物影響試験を行うとともに、生物影響が認められた排水については毒性要因物質の推定と削減方法の検討いわゆる TRE/TIE の実施例を紹介する。

日本版 WET の導入により、事業者排水の安全性評価に加え、生物影響がある場合の TRE/TIE 手法を実用化し、設備更新提案まで実施することで水処理総合メーカーとして排水管理のワンストップソリューションを目指している。

キーワード：WET, 生物影響試験, TRE, TIE

原稿受付 2015.6.1

EICA: 20(1) 20-24

## 1. はじめに

近年、生活や産業の高度化により伴い生じる多種多様な化学物質が環境中に放出されており、それに伴う野生生物への悪影響やヒトへの健康被害に対して関心が深まっている。WHO（世界保健機構）では、飲料水水質ガイドラインに新たな生物影響試験が導入され<sup>1)</sup>、米国ではガイドライン値が設定されてすでに運用されている。さらに米国では、工場排水にも生物影響試験が導入され、US-EPA（米国環境庁）による WET（Whole Effluent Toxicity：全排水毒性）システムが実施されている<sup>2)</sup>。米国 WET の大きな特徴として、基準を超過した生物影響が排水に認められた場合、原因物質の同定や除去方法の検討、つまりそれが排出される過程を見出し、排水の生物影響を削減することが義務づけられている。その工程は TRE（Toxicity Reduction Evaluation：毒性削減評価）/TIE（Toxicity Identification Evaluation：毒性同定評価）と呼ばれ、毒性原因の追究・削減までの実施手順書が US-EPA で示されている<sup>3)</sup>。国内の工場排水は、水質汚濁防止法に基づいた生活環境項目 15 項目と、健康項目 28 項目のみが規制<sup>4)</sup>対象であり、日々増え続けている多様な化学物質への管理が十分に行われていない可能性がある。また、工場排水に限らず、一般的に環境中では化学物質が単独に存在するこ

とはありえず、通常、複数の化学物質が同時に存在する。そのため、物質同士の相互作用により、有害性がどのように変化するかは非常に重要かつ複雑な問題である。一般的に複合作用は、相加、相乗あるいは拮抗のいずれかであるが、その作用が、どの物質の組み合わせで、どの濃度で、どの混合割合で起こるかを個々の物質の試験データから予測することは、極めて困難な課題と考えられている<sup>5)</sup>。そこで、その一つの解としてわが国では、環境省を中心に、総体的に排水中化学物質の影響を評価する手段として、生物応答を用いた排水試験法が検討案<sup>6)</sup>にまとめられている。ところがわが国では生物影響試験の結果で生物影響が認められた事業場排水に対して、その改善手法の報告は極めて少ない<sup>7,8)</sup>。

我々は、生物影響試験の導入と試験結果の信頼性を確保するための標準物質を用いた感受性試験に取組み、TRE/TIE の実施例については、金属製品製造業の工場排水について、生物影響試験を行い、生物影響が認められた排水については毒性要因物質の推定と削減方法の検討を行ったので紹介する。

## 2. 生物影響試験

測定機器を購入すればすぐに分析ができる化学分析

とは異なり、生物影響試験は、生物を飼育するところから始めるため、試験技術の確立に長期間が必要である。神鋼環境ソリューションは、2011年度から開始された国立研究開発法人（旧；独立行政法人）国立環境研究所のレファレンスラボの生態影響試験実習セミナーに第一回目から参加し生物影響試験に不可欠な生物管理と慢性影響の評価手法を習得した。並行して技術研究所内に、2012年度からWET試験に用いる生物の飼育設備を整え、まず、3種類の生物の中で適正な生育が最も難しいとされているニセネコゼミジンコの飼育を開始し、同年秋からゼブラフィッシュの飼育、2013年夏からムレミカヅキモの培養を行い3種類の生物の飼育及び培養設備の整備が完了した。実排水試験の実施も可能となり、実排水でのデータ蓄積を行っている。実排水での試験結果の精度と信頼性を確保するためには、試験に用いる生物の適正な飼育・培養が重要である。また、試験結果の精度と信頼性を確保するために標準物質を用いた感受性試験を実施し、日々、生物の健全性を確認している。

### 3. 感受性試験による精度と信頼性確保

試験結果の精度と信頼性を確保するために、定期的に標準物質を用いて、ニセネコゼミジンコ、ゼブラフィッシュ、ムレミカヅキモを用いた感受性試験を実施している。実施の一例としてムレミカヅキモを用いた感受性試験の取組みを紹介する。

#### (1) ムレミカヅキモの感受性試験方法

淡水藻類 *P. subcapitata* を用いる生長阻害試験法は、生物応答を用いた排水試験法（検討案）<sup>6)</sup> に従い行った、試験における同一濃度での繰り返し数は、対照区は6、濃度区は3とした。試験濃度は公比2として、5被検濃度区を設定した。5被検濃度区のニクロム酸カリウム濃度は、0.125 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/Lとした。前培養した供試藻類の生物量を測定し、試験溶液中の初期生物量が  $5 \times 10^3$  cell/mLとなるように希釈調整し、試験溶液に添加した。ばく露開始後は、24, 48, 72時間後に1 mLあたりの細胞数を測定した。

試験成立の条件は、以下の項目をすべて満足することとした。

- ① 対照区の生物量がばく露期間中に少なくとも16倍増加すること
- ② 対照区の毎日の生長速度の変動係数がばく露期間を通じて35%を超えないこと
- ③ 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数が7%を超えないこと

統計解析は、大分大学の吉岡によって開発され、日本環境毒性学会のEcoTox-Statistics<sup>9)</sup>のTG201に

よって実施した。Bartlett検定とDunnett多重比較検定を用いて藻類の生長速度を算出し、対照区と対照区を除いた各濃度区とを比較した。判定は、Bartlett検定で等分散性が認められた場合、パラメトリック手法による一元配置分散分析(ANOVA)により試験区間内に有意差があるかを検定した。等分散性が認められない場合、ノンパラメトリック手法により有意差があるかを検定した。有意差が認められた場合、Dunnett多重比較検定にて、危険率5%未満を有意として、NOEC(No Observed Effect Concentration: 無影響濃度)を推定した。有意差が認められなかった場合、NOECは最高濃度区以上とした。

#### (2) ムレミカヅキモの感受性試験結果と考察

ムレミカヅキモの試験成立条件①～③のデータと、NOECを用いた健全性の確認データを図1に示す。

試験成立条件である対照区の①増殖倍率は158～332倍 ②生長速度の変動係数は15～32% ③繰り返し間の生長速度の変動係数は1～5%となり、すべての項目において成立条件を満足することができた。標準物質を用いたNOECも0.25 mg/Lで安定しており、生物の適正な飼育・培養を行なっていることが確認でき、現在も継続している。

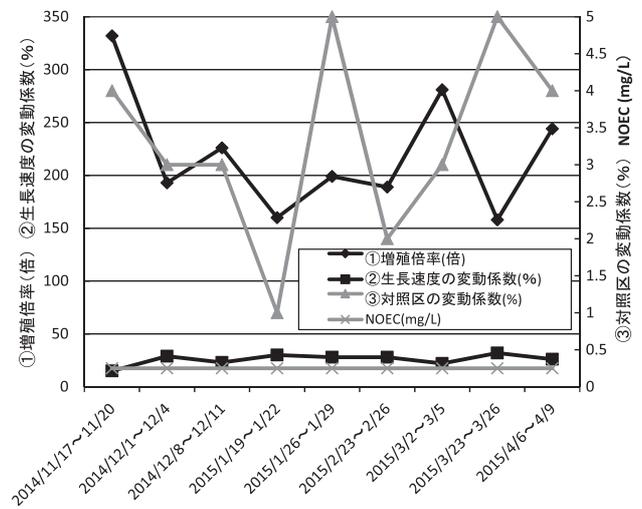


図1 ムレミカヅキモの健全性管理データ

### 4. 毒性物質削減と同定のためのTRE/TIE手法<sup>10)</sup>

生物応答を用いた排水試験法（検討案）<sup>6)</sup> に従い、金属製品製造業工場排水放流口にて日にちを変えて2回行い、それらを6月5日採水試料（以下試料Aと称する）と7月1日採水試料（以下試料Bと称する）の別々に被験液とした。排水の化学分析結果、排水の生物影響試験結果及び事業者への聞き取り調査結果をも

とに、毒性要因物質の候補を推定した。推定された毒性要因物質の除去試験後の処理水を除去前の生物影響試験結果と比較した。そこで影響が軽減されていれば、除去された物質などが毒性要因物質の可能性が高いと考える TRE 手法の考え方を採用した。今回は、生物影響試験にて、ミジンコのみ毒性影響を確認したため、ミジンコに対する毒性影響削減を目標とした。

#### 4.1 ミジンコ繁殖試験方法<sup>6)</sup>

ミジンコ繁殖試験法は、生物応答を用いた排水試験法（検討案）に従い実施した。当研究所にて維持育成した *C. dubia* から産まれた 24 時間以内の仔虫を試験に用いた。試験における同一濃度での繰り返し数は 10、試験濃度は公比 2 とし、5~80% の 5 濃度区を設定した。このとき、同じ親から産まれた同一腹仔の仔虫を対照区を含むすべての希釈段階に配置した。ばく露開始後は、毎日ミジンコの生死観察と生まれた仔虫の総数を計測し、結果を記録した。試験は対照区の試験個体の 60% あるいはそれ以上が 3 腹産んだ時点で終了し、すべてのばく露区の産仔を集計した。ただし、ばく露期間は最長でも 8 日間とした。

試験成立の条件は、以下の項目をすべて満足することとした。

- ① 対照区の試験個体の死亡率が 20% 以下であること
- ② 対照区の試験個体にて最大 8 日間に 60% 以上が 3 腹分の産仔をしていること
- ③ 対照区の試験個体の合計産仔数が、最初の 3 腹分を平均して 15 個体以上であること

統計解析は、EcoTox-Statistics Ver. 2.6 の TG211 によって実施した。Bartlett 検定と Dunnett 多重比較検定を用いて、産仔数の対照区と対照区を除いた各濃度区とを比較した。判定は、Bartlett 検定で等分散性が認められた場合、パラメトリック手法による一元配置分散分析 (ANOVA) により試験区間内に有意差があるかを検定した。等分散性が認められない場合、ノンパラメトリック手法により有意差があるかを検定した。有意差が認められた場合、Dunnett 多重比較検定にて、危険率 5% 未満を有意として、NOEC を推定した。有意差が認められなかった場合、NOEC は最高濃度区以上とした。

#### 4.2 毒性要因物質の除去試験方法

##### (1) キレート樹脂吸着処理試験方法

イミノジ酢酸基をキレート形成基にもつ樹脂エポラス (MX-10, ミヨシ油脂製) を内径  $\phi 22$  mm, 高さ 1,100 mm のアクリル製カラムに容量 150 mL (400 mm) 充填したものを金属除去カラムとして用意した。試料は 2% NaOH で pH 9 に調整した。試験開始前に

イオン交換水をカラムに連続通水し、キレート樹脂を洗浄した。その後試料を定量ポンプにより連続的に上向流でキレート樹脂を充填したカラムに SV (空塔速度) 7 (1/h), LV (線速度) 2.8 m/h の条件で通水した。キレート樹脂層容積の 12 倍量の試料 1.8 L を通水した。得られた処理水の化学分析を実施し同時に生物影響試験に供した。ただし、生物影響試験では、pH による生物影響が無いように硫酸で pH 7 付近に調整した。処理水は全量を回収して化学分析に供した。

##### (2) 凝集処理試験方法

凝集処理試験では、無機凝集剤として一般的な塩化第二鉄 (38% FeCl<sub>3</sub> 溶液) を使用した。さらに、高分子重金属捕集剤としてジチオカルバミン酸基とチオール基をキレート形成基にもつエポフロック (L-1, ミヨシ油脂製) を併用した。さらに、高分子凝集剤としてアクリルアミドアクリル酸ソーダ系のアニオンポリマーを使用した。これら高分子凝集剤使用時は、pH 7 付近に調整した。試験には 6 連式のジャーテスター (凝集処理試験装置) を使用した。凝集処理試験では、まず 100 mL ビーカーとスターラーを用いた少量サンプルで無機凝集剤注入率の予備試験を行い、続いて 500 mL ビーカーとジャーテスターを用いた多量サンプルで本試験を行った。凝集処理試験で得られた上澄み液を、実装置の砂ろ過 (孔径 3~7  $\mu$ m) を想定し、同様の状態にするために孔径 7  $\mu$ m のセルロース製ろ紙 (No.5A, ADVANTEC 社製) にてろ過した。そのろ過水にて毒性要因候補物質が削減されているかを化学分析で確認し、生物影響試験に供した。キレート樹脂吸着処理試験と同じく、生物影響試験前に pH 7 付近に調整した。

#### 4.3 毒性要因物質の添加試験方法

毒性要因物質の除去試験後に、生物影響が認められなくなった試料に、再び除去された物質を添加し生物試験を行った。添加試験方法は、Zn 濃度が高い試料 A と同じ濃度になるように、試料 B に、化学分析用 Zn 溶液 1,000 mg/L (金属分析用標準液, KANTO KAGAKU 製) を添加した溶液を作成した。それぞれの試料の化学分析を行った。

#### 4.4 TRE/TIE 結果および考察

試料 A と試料 B の異なる工場排水の化学分析結果には大きな差異が確認されなかった。事業者への聞き取り調査から、金属製品の製造時に、Ni, Zn, Pb が使用されていたので、これらの物質を定量すると、試料 A の Zn は 460  $\mu$ g/L, 試料 B の Zn は 32  $\mu$ g/L と、大きな差異が確認された。試料 A と試料 B に対する、魚、ミジンコ、緑藻の生物影響試験結果は、魚と緑藻の NOEC は、どちらも 80% 以上だった。しかし、ミ

ジンの NOEC は、試料 A が 5 % 未満、試料 B が 40% であった。

キレート樹脂を充填したキレート樹脂吸着処理結果を表 1 に示す。試料 A の Zn は 460  $\mu\text{g/L}$  から 15  $\mu\text{g/L}$ 、Ni は 3  $\mu\text{g/L}$  から 1  $\mu\text{g/L}$  未満に改善された。処理前の生物影響試験ではミジンコに毒性影響がみられたが、キレート処理水は、すべての希釈段階において、ミジンコの親の死亡率、繁殖率に影響が認められなかった。よって、キレート樹脂吸着を用いてミジンコへの毒性影響は効果的に消失でき、Zn 及び Ni が毒性要因物質であると示唆された。

試料 A の凝集処理前後の化学分析結果を表 2 に示す。フロック生成に必要な  $\text{FeCl}_3$  の注入率は 50 mg/L であり、高分子重金属補修剤無しでも Zn と Ni の処理効果を確認した。 $\text{FeCl}_3$  50 mg/L のみで処理した水は、図 2 に示す通りすべての希釈段階において、ミジンコの親の死亡率、繁殖率に影響が認められなかった。

よって、 $\text{FeCl}_3$  凝集処理によりその処理水のミジンコに対する影響を消失でき Zn と Ni の毒性が示唆された。

凝集処理試験後の Zn 添加試験においても、ミジンコの死亡率、繁殖率に影響が認められ Zn が毒性物質であることが示唆された。

Ni については、キレート処理では 1  $\mu\text{g/L}$  未満まで除去されミジンコへの影響が消失したが、 $\text{FeCl}_3$  50 mg/L のみで凝集処理した水の Ni 濃度は 3  $\mu\text{g/L}$  から 2  $\mu\text{g/L}$  に低減したものの、報告されている Ni の EC25 (25% Effect concentration: 25% 影響濃度) 0.64  $\mu\text{g/L}$  を超えていた。しかし、ミジンコへの毒性影響が消失されたのは、凝集処理試験に用いた塩化第二鉄に含まれる Fe が Ni の毒性影響を緩和した可能性が考えられる。

ミジンコへの毒性要因物質は、Zn と Ni の可能性が高いことが示唆されたが、水中でのスペシエーションについては解明できず、明確な毒性要因物質は断定で

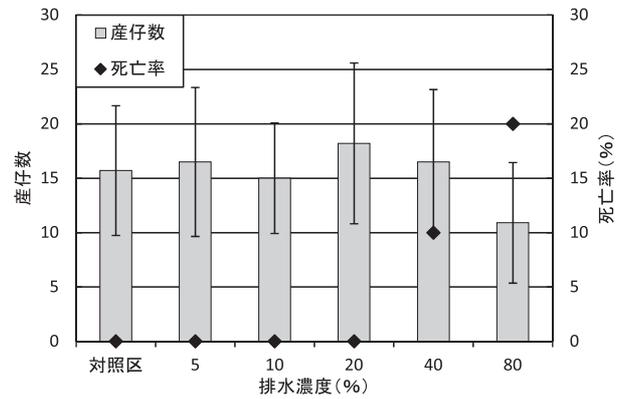


図 2 ミジンコ繁殖試験結果 ( $\text{FeCl}_3$  50 mg/L)

きなかった。特に Ni の場合には凝集剤である Fe イオンとの相互作用による毒性を打ち消す効果などを仮定しないと解釈できない結果が得られた。

これらから、キレート樹脂吸着及び  $\text{FeCl}_3$  単独の凝集処理ともに、Zn と Ni が削減されると共にミジンコへの影響が消失し、毒性削減に有効であることを確認した。毒性削減手法としては、経済性を考慮するとキレート樹脂吸着法よりも凝集沈殿設備に  $\text{FeCl}_3$  の添加設備を追加する方法が有効であると考えられる。

## 5. ま と め

生物影響試験の高い信頼性を得るための感受性試験、金属製品製造業の工場排水で TRE/TIE 手法を用いた毒性要因物質の推定、その除去方法まで確認することが出来た。この TRE/TIE の取組みを第一歩として、我々は日本版 WET を活用し、事業場排水の安全性評価、生物影響がある場合の改善手法の提案及び設備更新までの全てを行える、排水管理のワンストップソリューションを目指している。

## 参 考 文 献

- 1) 国立保健医療科学院：飲料水ガイドライン Guidelines for drinking-water quality, 第4版 (2011)
- 2) USEPA: Short-term methods for estimation the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, Fourth Edition (2002)
- 3) USEPA: Clarifications Regarding Toxicity Reduction and Identification Evaluations in the National Pollutant Discharge Elimination System Program (2001)
- 4) 環境省：一律排水基準, <http://www.env.go.jp/water/impure/haisui.html>
- 5) 若林明子：化学物質と生態毒性, pp.167-177 (2003),
- 6) 環境省：生物応答を用いた排水試験法 (検討案), 排水 (環境水) 管理のバイオアッセイ技術検討分科会 (2013)
- 7) 環境省：生物応答を利用した水環境管理手法検討調査業務・報告書 (2013)
- 8) Norberg-King, T. J., Ausley, L. W., Burton, D. T., Goodfellow,

表 1 キレート樹脂吸着試験の水質分析結果

	pH (-)	Ni ( $\mu\text{g/L}$ )	Zn ( $\mu\text{g/L}$ )
試料 A	8.6	3	460
試料 B	7.1	2	32
試料 A キレート処理水	10.6	<1	15

表 2 凝集処理試験の水質分析結果

	pH (-)	Ni ( $\mu\text{g/L}$ )	Zn ( $\mu\text{g/L}$ )
試料 A	8.6	3	460
$\text{FeCl}_3$ 50 mg/L	8.93	2	2
エポフロック 5mg/L+ $\text{FeCl}_3$ 50 mg/L	8.81	1	3

- W. L., Miller, J. L., and Waller, W. T. : Toxicity reduction and toxicity identification evaluation for effluents, ambient waters, and other aqueous media, SETAC Press (2005)
- 9) 日本環境毒性学会 : EcoTox-Statistics, <http://www.intio.or.jp/jset/ecotox.htm>
- 10) 藤原尚美, 野中信一, 豊久志朗, 鎌迫典久 : 金属製品製造工業の WET を用いた排水中毒性要因の推定とその改善例, 環境化学, 25, 35-42 (2015)